

## 신생아 비강에서 분리된 황색포도구균의 병원성 인자와 관련 유전자

부산대학교 의과대학 미생물학교실, 소아과학교실\*

김영부 · 문지영 · 박재홍\*

### Associated-Genes and Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* Isolated from Nasal Cavity of Neonates

Yung Bu Kim, Ji Young Moon and Jae Hong Park, M.D.\*

*Departments of Microbiology and Pediatrics\*, College of Medicine,  
Pusan National University, Busan, Korea*

**Purpose :** Nosocomial infection with *Staphylococcus aureus*, especially methicillin resistant *S. aureus*, has become a serious concern in the neonatal intensive care unit. The aim of this study is to investigate the virulence factors, and the relationship between the antibiotic resistance and the associated genes of *Staphylococcus aureus* isolated from nasal cavity of neonates.

**Methods :** Fifty one isolates of *S. aureus* were obtained from nasal swab taken in 28 neonates in the NICU and nursery of Pusan National University Hospital between February and May, 2001. They were tested in regard to antibiotic susceptibility, coagulase test and typing, plasmid DNA profile, as well as reactivity to enterotoxin A-E(*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*) genes and toxic shock syndrome toxin-1(*tst*) gene by polymerase chain reaction(PCR). Associated genes such as *mecA*, *mecR1*, *mecI*, and *femA* were also determined by PCR. The origin of MRSA strains was assessed using DNA fingerprinting by arbitrarily-primed polymerase chain reaction(AP-PCR).

**Results :** Twenty three(45.1%) and six(11.8%) isolates were resistant to oxacillin and vancomycin respectively. Multidrug resistance to three or more of the antibiotics tested was observed in 51.0% of the isolates. Forty two isolates were coagulase positive and twenty two isolates had *mecA* gene. Sixteen isolates had both *mecA* and *femA* genes and had type I-III plasmids. 64.7% of isolates carried *sec* gene, and 80.4% carried *tst* gene. DNA fingerprinting by AP-PCR for 12 MRSA strains showed 10 distinct patterns, suggesting different origins.

**Conclusion :** We confirmed that the prevalence of nasal carriage of *S. aureus* and the incidence of antimicrobial-resistant *S. aureus*, especially vancomycin resistance, is very high in neonates who were admitted in NICU and nursery. It is possible that these pathogens are responsible for serious nosocomial infections in neonates. The need for improved surveillance and continuous control of pathogens is emphasized. (J Korean Pediatr Soc 2003;46:24-32)

**Key Words :** *Staphylococcus aureus*, Antibiogram, Virulence factor

### 서 론

황색포도구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)은 원내 감염의 중요한 원인균으로<sup>1)</sup> 최근 methicillin 뿐 아니라 vancomycin에도 내성이 보이는 균주가 분리되어 항균 치료에 어려움을

을 주고 있다<sup>2)</sup>. 다제내성 *S. aureus*에 의한 원내 감염은 *mecA* 유전자를 보유하는 *S. aureus*에 의해 건강한 의료종사자나 병원 내 환경이 오염되어 면역 기능이 저하된 환자에게 감염을 일으키게 되며, 특히 신생아에서는 표피바리 증후군, 결막염, 급성 세균성 신염, 화농성 관절염, 패혈증, 괴사성 장염 등 임상적으로 심각한 문제를 일으킬 수 있다<sup>3, 4)</sup>.

*S. aureus*는 세포벽 합성 효소인 페니실린 결합 단백질(penicillin-binding protein 2', PBP2')을 생성하여  $\beta$ -lactam계 항생제에 내성을 나타낸다<sup>5)</sup>. 염색체에 존재하는 PBP2'의 구조 유

접수 : 2002년 7월 4일, 승인 : 2002년 11월 18일  
책임저자 : 김영부, 부산대학교 의과대학 미생물학교실  
Tel : 051)240-7712 Fax : 051)243-2259  
E-mail : ybkim@pusan.ac.kr

전자 *mecA*는 *S. aureus* 뿐만 아니라 methicillin-내성 coagulase-음성 포도구균(methicillin resistant coagulase negative staphylococci)에도 있다<sup>6)</sup>. 그러나 *mecA* 유전자를 보유하면서 methicillin 내성이 없는 균주도 있어, methicillin 내성이 단순히 *mecA* 유전자의 존재 뿐 아니라<sup>7,8)</sup>, *mecA* 유전자의 조절 유전자인 *mecI*, *mecR1*, *femA*, nuclease 및 16S ribosome 등도 관계가 있음이 밝혀졌다<sup>9,10)</sup>. 그러나 이러한 조절 유전자들의 역할에 대한 연구는 미미하며, 내성의 정도와 내성 관련 유전자의 상관성에 대한 보고가 거의 없는 실정이다. 또한 *S. aureus*가 지역별, 병원별로 어느 정도 상재하고 있는지, 항생제 감수성의 양상이나 내성 관련 유전자 등에 대한 조사가 선행되어야 이에 대한 예방이나 치료 방향의 설정이 이루어 질 수 있을 것이다.

이에 본 연구는 입원 중인 신생아의 비강에서 *S. aureus*를 분리하여 항생제 감수성의 양상과 내성 관련 유전자인 *mecA*, *mecR1*, *mecI* 및 *femA* 유전자를 검출하여 내성의 정도와 내성 관련 유전자의 상관관계를 규명해 보고자 하였다. 또한 coagulase 형별, plasmid DNA의 양상, 장독소 A, B, C, D, 및 E의 유전자, 독소 속 증후군 독소(toxic shock syndrom toxin, TSST-1) 등의 유전자 검출을 실시하고, *S. aureus*의 역학적 해석을 위하여 arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR)법에 의한 유전자 형별을 실시하였다.

## 대상 및 방법

### 1. *S. aureus* 분리 및 동정

2001년 2월부터 약 3개월 동안 부산대학병원의 신생아 중환자실 및 신생아실에 입원한 신생아 28명을 대상으로 멸균된 면봉을 이용하여 이틀 간격으로 2-3회씩 총 120회의 nasal swab을 실시하였다. 채취된 비강 분비물은 7.5% NaCl이 첨가된 보통 한천 배지에 접종한 후, 37°C에서 24시간 배양하여 발육한 집락 중 황색 집락을 관찰하고, coagulase 생산능, 만니톨 분해, 카탈라제 검사, 프로테아제 생성, 용혈성 및 DNase 생성능을 검사하여 *S. aureus* 균을 분리하였다. 또한 LB 한천 배지에서 37°C, 24시간 배양한 후 집락을 McFarland 0.5로 조정하여 API Staph medium에 부유시킨 다음, API Staph kit(bioMerieux, Marcy l'Etoile, France)에 접종하여 얻어진 결과를 최종적으로 API 20E Ver. 4.0 program을 이용하여 분리 동정된 51주의 *S. aureus*를 실험 균주로 사용하였다.

### 2. 항생제 감수성 검사

항생제 검사에 사용한 배지는 Muller Hinton broth와 Muller Hinton agar(MHA; Difco. Lab., Detroit, MI, USA)를 사용하였다. 사용한 항생제는 모두 Sigma 회사 제품으로 aminoglycoside계 gentamicin(GM), cephalosporin계 cephalothin(CP)과 macrolide계인 erythromycin(EM) 및 그 외 기타 항생제로서 tetracycline(TC), oxacillin(OX), vancomycin(VM) 등 포함 6

종류를 사용하였다. 항생제 감수성 검사는 한천 평판 희석법으로 실시하였으며, 각 항생제를 National Committee for Clinical Laboratory Standards가 추천한 방법<sup>11)</sup>에 따라 규정된 용매에 용해시킨 다음, 2배 계단 희석하여 소정 농도의 항생제가 함유된 MHA에 Steer's multiple inoculator로 접종하여 37°C, 18-24시간 배양한 후 발육 유무로 최소 발육 저지 농도(minimal inhibitory concentration, MIC)를 결정하였다.

### 3. Coagulase 생성 및 형별 검사

시험관법을 이용하여 멸균된 시험관에 사람 혈장 1.5 mL를 분주하고, 18시간 배양균액 0.1 mL를 접종하여, 37°C 항온기에서 3시간, 6시간 및 24시간 후에 응고 여부를 관찰하였다<sup>12)</sup>. Coagulase 생성 양성균에 대한 coagulase 형별 실험은 PCR법<sup>13)</sup>으로 실시하였다. Coagulase 형별 실험을 위한 primer pair는 COAG-2(5'-CGAGACCAAGATTCAACAAG-3'), COAG-3(5'-AAAGAAAACCACTCACATCA-3')을 바이오니아(Bioneer, Daejeon, Korea)에 주문 제작하여 사용하였다. 실험 균주의 DNA 추출은 가열법으로 5 mL LB broth에 접종하여 37°C, 18시간 진탕 배양한 균액을 95°C에서 10분간 가열하고, -20°C 냉동고에 보존해 두었다가 실험에 사용하였으며, 증폭 과정은 denaturation 94°C, 20초, annealing 57°C, 20초, extension 70°C, 15초의 과정을 30 cycles로 실시하여 1.0% agarose에서 전기영동한 후 ethidium bromide(EtBr)로 염색하고 UV transilluminator(SL-20 DNA image Visualizer, Seolin Scientific Co., Ltd.)로 확인하였다.

### 4. Plasmid DNA의 분리 및 크기 측정

Plasmid DNA의 분리는 Birnboim과 Doly법<sup>14)</sup>으로 Flexi-Prep Kit(Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Sweden)를 사용하여 분리하였으며, plasmid DNA의 크기는 23,130 bp에서 125 bp까지 다양한 크기의 marker(phage λ DNA-HindIII digest, TaKaRa Biomedicals, Tokyo, Japan)를 사용하여 이동 거리를 비교하여 산정하였다. 전기영동은 0.8% agarose gel 전기영동장치(Mupid™ COSMO BIO Co., LTD.)를 이용하여 100 V, 40 분간 전기영동하여 EtBr로 염색한 후 UV transilluminator에서 amplicon을 확인하였다.

### 5. PCR법에 의한 *mecA*, *mecR1*, *mecI* 및 *femA* 유전자 검출

Table 1과 같이 primer는 *mecA*, *mecR1*, *mecI* 및 *femA* 유전자의 염기 배열 중에서 특이 영역 oligonucleotide를 합성한 primer로 사용하였다<sup>5, 6, 15)</sup>. 실험 균주의 DNA 추출은 상기의 가열법으로 실시하였으며, 증폭 과정으로 denaturation을 94°C에서 1초간, annealing은 55°C에서 1초간, extension은 72°C에서 10초간 40 cycles로 실시하였다. 각각의 유전자 검출을 위하여 10 μL의 PCR 증폭 산물과 molecular weight marker(phage ϕ X174 HaeIII digested: TaKaRa Biomedicals, Tokyo, Japan)

**Table 1.** Sequence of Primer Pairs for Polymerase Chain Reaction in Detecting the Target DNA Fragments

| Target gene product | Sequence(5'-3') of primer pair                           | PCR product |
|---------------------|--|-------------|
| <i>mecA</i>         | 5'-GAAGATGGCTATCGTGTAC-3'<br>5'-CTGGAACCTTGTGAGCAGAG-3'  | 316 bp      |
| <i>mecR1</i>        | 5'-TCAGTTCATTGCTCACGATA-3'<br>5'-CAACAACTACCAAATACCC-3'  | 326 bp      |
| <i>mecI</i>         | 5'-CTGCAGAATGGGAAGTTATG-3'<br>5'-ACAAGTGAATTGAAACCGCC-3' | 268 bp      |
| <i>femA</i>         | 5'-ATAACGAGGTCATTGCAGCT-3'<br>5'-TTACCTGTAATCTCGCCATC-3' | 229 bp      |

를 2% agarose gel 전기영동하고, DNA 단편은 EtBr로 염색하여 UV transilluminator에서 amplicon을 확인하였다.

**6. PCR법에 의한 장독소 A, B, C, D, E 및 TSST-1 유전자 검출**

PCR법으로 장독소 A, B, C, D 및 E 유전자(*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*)와 TSST-1 유전자(*tst*)의 검출을 실시하였다. *S. aureus*의 장독소 및 TSST-1 유전자용 primer set(TaKaRa Biomedicals, Tokyo, Japan)로 장독소 A는 SEA-1, SEA-2(Code No. S009), 장독소 B는 SEB-1, SEB-2(Code No. S010), 장독소 C는 SEZ-1, SEZ-2(Code No. S011), 장독소 D는 SED-1, SED-2(Code No. S012), 장독소 E는 SEE-1, SEE-2(Code No. S013)을 사용하였다. 그리고 TSST-1에 대해서는 TST-1, TST-2(Code No. S015)를 사용하였다. 가열 균액은 coagulase 형별법과 동일하게 실시하였으며 증폭 과정은 denaturation을 94℃에서 1분, annealing은 55℃에서 1분, extension은 72℃에서 1분간 35 cycles로 실시하였다. 10 μL의 PCR 증폭 산물과 molecular weight marker(phage φX174 *Hae*III digested: TaKaRa Biomedicals, Tokyo, Japan)를 2% agarose gel 전기영동하고, DNA 단편은 EtBr로 염색하여 UV transilluminator에서 amplicon을 확인하였다.

**7. Random amplified polymorphic DNA(RAPD)법에 의한 유전자 형별 검사**

**1) DNA의 조제**

*S. aureus* 51주 중에서 *mecA* 유전자를 보유한 MRSA 12주를 임의적으로 선택하여 실험 균주로 사용하였다. 실험 균주를 5 mL LB broth(bactotryptone; 10 g, yeast extract; 5 g, NaCl; 10 g, H<sub>2</sub>O; 1,000 mL, pH 7.5)에 접종하여 37℃에서 18-24시간 진탕 배양한 후, 원심분리하고 균체를 200 μL의 TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 부유시켰다. 여기에 20% SDS 용액 20 μL를 첨가하고 65℃에서 60분간 가온한 후, phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1)을 500 μL 첨가하고 약 20초간 진탕하고 15,000 rpm, 15분간 원심분리한 후, 상층액을 멸균된 eppendorf 시험관에 옮겨서 1/10량의 3 M sodium acetate(CH<sub>3</sub>COONa)액과 100% ethyl alcohol를 1.5

배를 첨가하여 서서히 혼합시키면서 DNA를 추출하였다. 마지막으로 침전물을 70% ethyl alcohol로 세척 건조시켜 멸균 증류수로 용해시킨 다음, UV spectrophotometer(UV-1201, Shimadzu Co., Japan)를 이용해서 DNA 농도를 25 ng/μL가 되도록 정량하여 AP-PCR 실험에 template DNA로 사용하였다<sup>16)</sup>.

**2) AP-PCR법에 의한 유전자 형별**

AP-PCR 실험은 RAPD Analysis Primer Set(Pharmacia Biotech, USA)를 사용하였다. 6종류의 primer는 primer 1(5'-GGTGC GGGAA-3'), primer 2(5'-GTTTCGCTCC-3'), primer 3(5'-GTAGACCCGT-3'), primer 4(5'-AAGAGCCCGT-3'), primer 5(5'-AACGCGAAC-3'), primer 6(5'-CCCGT-CAGCA-3')들을 사용하였다. 증폭 과정은 95℃에서 4분간 예비가열한 후, denaturation은 95℃에서 1분, annealing은 36℃에서 1분, extension은 72℃에서 2분간 45 cycles로 실시하였다. 10 μL의 PCR 증폭 산물과 molecular weight marker로 phage φX174 *Hae*III digested(TaKaRa Biomedicals, Tokyo, Japan)와 phage λ DNA *Hind*III digested를 혼합하여 사용하였으며, 1.5% agarose gel에서 전기영동하고, DNA 단편은 EtBr 염색하여 UV transilluminator에서 확인하였다<sup>17)</sup>.

**결 과**

**1. 항생제 감수성 검사**

51주의 *S. aureus*를 대상으로 한 MIC의 결과는 Table 2와 같으며, TC의 경우 MIC<sub>50</sub>이 2 μg/mL, MIC<sub>90</sub>이 16 μg/mL로 가장 낮았고, 그 다음으로 GM의 MIC<sub>50</sub>이 16 μg/mL, MIC<sub>90</sub>이 32 μg/mL로 비교적 내성을 보였다. CP와 VM에서는 대부분의 균주가 감수성을 나타내었으나, VM의 경우 MIC<sub>90</sub>이 256 μg/mL로 다른 항생제에 비해 비교적 높았다. GM(39주, 76.5%), EM(39주, 76.5%), OX(23주, 45.1%), TC(7주, 13.7%), VM(6주, 11.8%) 및 CP(4주, 7.8%)의 순으로 항생제 내성을 나타냈으며, 항생제 감수성 검사 결과 MRSA는 23주(45.1%)였다. 항생제 다제내성 양상은 Table 3와 같다. 4가지 항생제에 대해 내성을 보인 경우가 5주, 3가지 항생제에 대한 내성이 21주, 2가지에 대한 내성이 15주, 한 항생제에만 내성을 보인 경우가 6주였으며, 6가지 항생제에 모두 감수성을 보이는 경우는 1주 있었다.

**2. Coagulase 생성 및 coagulase 형별 검사**

51주의 *S. aureus* 중 42주(82.4%)가 coagulase 양성 균주였다(Table 4). 이중 *mecA* 및 *femA* 유전자 양성인 12주를 PCR법으로 coagulase 형별 검사를 실시한 결과 8종류, 즉 coagulase I형에서부터 VIII형으로 분류할 수 있었다. II형이 2주, VI형이 4주, 나머지는 각각 1주씩 형별되었다(Fig. 1).

**3. Plasmid DNA의 양상**

실험 균주 중에서 *mecA* 및 *femA* 유전자를 모두 보유한 16

**Table 2.** Susceptibilities of *Staphylococcus aureus* to Six Different Antimicrobial Agents

| Antimicrobial agents | MIC(µg/mL) |   |    |    |    |    |    |     |     |     |       | MIC <sub>50</sub> (µg/mL) | MIC <sub>90</sub> (µg/mL) | Resistance strains(%) |
|----------------------|------------|---|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|
|                      | <2         | 2 | 4  | 8  | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | 1,024 |                           |                           |                       |
| Tetracycline         | 27         | 0 | 13 | 4  | 7  | 0  | 0  | 0   | 0   | 0   | 0     | 2                         | 16                        | 7(13.7)               |
| Cephalothin          | 11         | 7 | 2  | 17 | 10 | 2  | 0  | 1   | 1   | 0   | 0     | 8                         | 16                        | 4( 7.8)               |
| Vancomycin           | 41         | 3 | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0   | 2   | 4   | 0     | 2                         | 256                       | 6(11.8)               |
| Oxacillin            | 7          | 2 | 1  | 18 | 13 | 4  | 1  | 0   | 2   | 1   | 2     | 8                         | 256                       | 23(45.1)              |
| Erythromycin         | 7          | 2 | 0  | 0  | 3  | 2  | 4  | 5   | 5   | 23  | 0     | 256                       | 512                       | 39(76.5)              |
| Gentamicin           | 4          | 2 | 3  | 3  | 23 | 13 | 0  | 0   | 0   | 3   | 0     | 16                        | 32                        | 39(76.5)              |

■ : Resistant strains

**Table 3.** Resistant Patterns of 51 *Staphylococcus aureus* Isolates to Six Different Antimicrobial Agents

| No. of resistant agents | Susceptibility* |    |    |    |    |    | No. of strains(%) |
|-------------------------|-----------------|----|----|----|----|----|-------------------|
|                         | TC              | CP | VM | OX | EM | GM |                   |
| 4                       | R               | S  | R  | R  | R  | S  | 1( 2.0)           |
|                         | R               | S  | S  | R  | R  | R  | 1( 2.0)           |
|                         | S               | R  | R  | R  | R  | S  | 2( 3.9)           |
|                         | S               | R  | S  | R  | R  | R  | 1( 2.0)           |
| 3                       | R               | S  | S  | S  | R  | R  | 4( 7.8)           |
|                         | R               | S  | S  | R  | S  | R  | 1( 2.0)           |
|                         | S               | S  | R  | R  | R  | S  | 2( 3.9)           |
|                         | S               | S  | R  | S  | R  | R  | 1( 2.0)           |
| 2                       | S               | S  | S  | R  | R  | R  | 13( 25.5)         |
|                         | S               | R  | S  | R  | S  | S  | 1( 2.0)           |
|                         | S               | S  | S  | R  | R  | S  | 1( 2.0)           |
|                         | S               | S  | S  | R  | S  | R  | 1( 2.0)           |
| 1                       | S               | S  | S  | S  | R  | S  | 12( 23.5)         |
|                         | S               | S  | S  | S  | S  | R  | 1( 2.0)           |
| 0                       | S               | S  | S  | S  | S  | R  | 5( 9.8)           |
|                         | S               | S  | S  | S  | S  | S  | 4( 7.8)           |
| Total                   |                 |    |    |    |    |    | 51(100.0)         |

\*R : resistant, S : susceptible

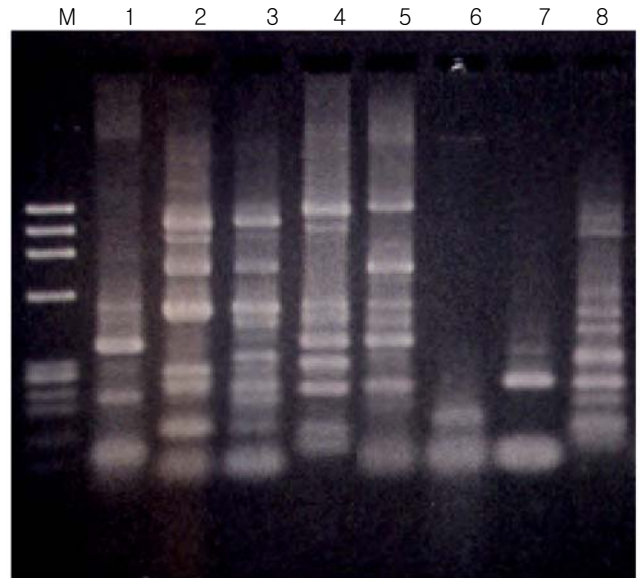
**Table 4.** Coagulase and Protease Production Rate in the 51 *Staphylococcus aureus* Isolates

| Test      | Positive   | Negative | Total    |
|-----------|------------|----------|----------|
| Coagulase | 42( 82.4%) | 9(17.6%) | 51(100%) |
| Protease  | 51(100.0%) | 0( 0.0%) | 51(100%) |

주를 대상으로 plasmid 양상을 검토한 결과, I형에서 III형으로 형별할 수 있었으며, I형이 7주, II형이 6주 그리고 III형이 2주였다. 또한 OX 및 VM에 내성을 보인 II형과 III형에서는 모든 균주가 35.5 kb의 plasmid DNA를 보유하고 있는 것으로 나타났다(Fig. 2).

**4. *mecA*, *mecA* 관련 유전자 및 *femA* 유전자의 검출**

PCR법을 이용한 *mecA* 유전자 검출에서 22주(45.1%)가 표적 유전자인 316 bp의 단편을 나타내었으며, *mecR1* 유전자는

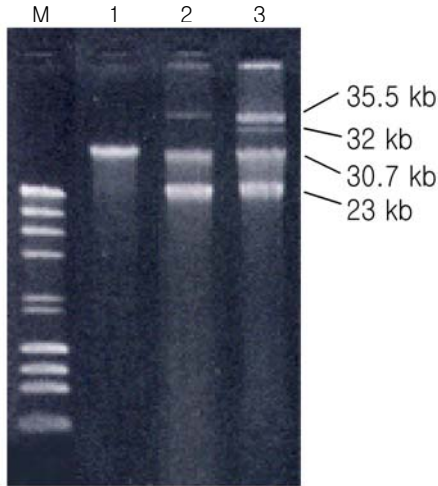


**Fig. 1.** Agarose gel electrophoresis of the *coa* gene. Comparison of representative MRSA strains by PCR. Lane M: phage  $\phi$ X174 DNA digested with *Hae*III(molecular size marker), lane 1: coagulase I type, lane 2: coagulase II type, lane 3: coagulase III type, lane 4: coagulase IV type, lane 5: coagulase V type, lane 6: coagulase VI type, lane 7: coagulase VII type, lane 8: coagulase VIII type.

18주(35.3%)에서 326 bp의 단편, *mecI* 유전자는 1주(2.0%)에서 268 bp의 단편, 그리고 *femA* 유전자는 17주(33.3%)에서 229 bp의 단편이 검출되었다(Fig. 3A-3D). *mecA* 유전자와 *femA* 유전자를 모두 보유한 균주는 16주(31.4%)였다. *mecA*만을 보유한 균주는 4주(7.8%), *femA*만을 보유한 균주는 1주(2.0%)였다(Table 5). *mecA*와 *mec* 조절유전자들의 유전자형을 4가지 즉, *mecA*형, *mecR1*형, *mecA-mecR1*형, 및 *mecA-mecR1-mecI*형으로 분류할 수 있었으며, 각각 14주(27.5%), 10주(19.6%), 7주(13.7%), 1주(2.0%)의 순서로 많았다(Table 5). 또한 *mecA* 및 *mecA* 관련 유전자와 항생제 다제내성과의 상관성에 대해서는 Table 6에서 보는 바와 같이 상관관계가 없었다.

**5. PCR법에 의한 장독소 A, B, C, D, E 및 TSST-1 유전자 검출**

*S. aureus* 51주 중 장독소 A, B, C, D, 및 E 유전자 보유 여부에 대한 검사에서 장독소 A, B, D, 및 E의 유전자는 전혀 검출되지 않았으나, 장독소 C의 유전자는 33주(64.7%)에서 146 bp의 단편이 검출되었다(Fig. 3E). 그리고 TSST-1 유전자 보



**Fig. 2.** Results of the plasmid DNA assay. Lane M: phage  $\lambda$  DNA digested with Hind III+phage  $\phi$ X174 DNA digested with HaeIII(molecular size marker), lane 1:I type, lane 2:II type, lane 3:III type.

유 여부는 41주(80.4%)가 양성이었다(Fig. 3F).

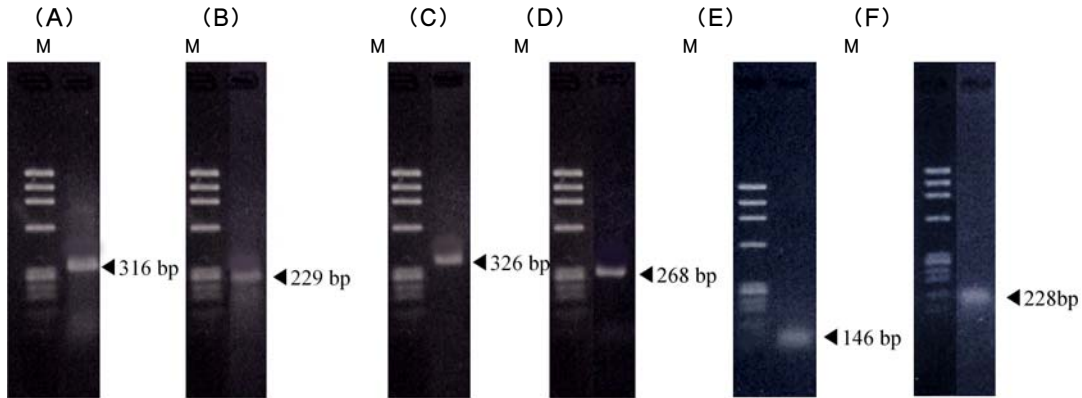
**6. 유전자 형별**

Coagulase 양성이며 *mecA* 및 *femA* 유전자를 보유한 MRSA 12군주에 대한 유전자 형별 검사의 결과는 Fig. 4와 같다. 6종류의 primer로 비교한 결과, primer 4를 제외하고는 차이를 관찰할 수 없었고 primer 4로 I형에서부터 X형으로 형별 분류할 수 있었다. II형에서 2주, X형에서 2주가 동일한 amplicon을 나타내어 동일한 유전자형임을 알 수 있었고, 나머지 10주는 전혀 다른 amplicon을 나타내었다.

**고 찰**

*S. aureus*는 원내 감염의 중요한 원인균으로 최근에는 MRSA 보다 심각한 vancomycin 내성 *S. aureus*의 감염증이 소아에서 증가하고 있다<sup>2)</sup>. *S. aureus*의 감염 경로는 환자간의 감염, 의료 종사자로부터 감염, 병원 내 환경 또는 의료 기구를 통한 감염, 또는 비강이나 인두에서 보균 상태로 있다가 내인성 감염을 일으키기도 한다<sup>3,4)</sup>.

소아에서 *S. aureus*의 분리 빈도를 보면 松村 등<sup>18)</sup>은 출생 체중 2,000 g 미만의 신생아 79명 중 48명(60.8%)이 입원 중에 1회 이상 *S. aureus*가 검출되었다고 보고하였으며, Sakata<sup>19)</sup>는 소아과 병동에 입원한 1,891명 중 비인두에서 *S. aureus*가 검출된 경우가 2.4%였고, 이중 1세 미만이 절반을 차지하였다고 하



**Fig. 3.** Agarose gel electrophoresis of PCR products to detect *mecA*(A panel), *femA*(B panel), *mecR1*(C panel), *mecI*(D panel), *sec*(E panel) and *tst*(F panel). Lane M:phage  $\phi$ X174 DNA digested with HaeIII(molecular size marker).

**Table 5.** Detection Rates of *mecA* and Related *mec*-gene in *Staphylococcus aureus* by PCR

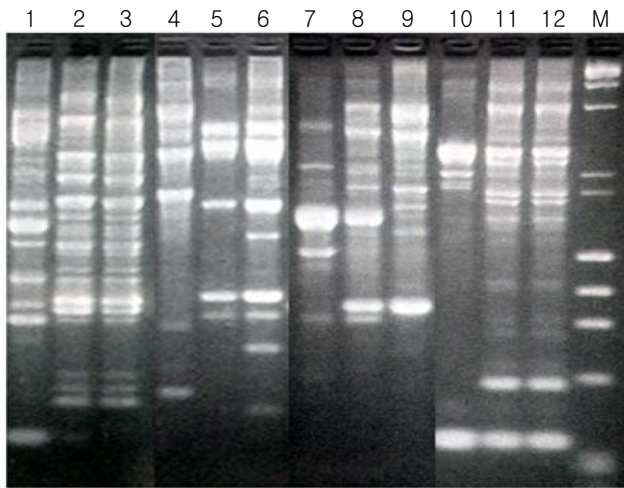
|                   | Types* |        |          |          |        |        |        |
|-------------------|--------|--------|----------|----------|--------|--------|--------|
|                   | I      | II     | III      | IV       | V      | VI     | VII    |
| No. of strains(%) | 4(7.8) | 1(2.0) | 10(19.6) | 10(19.6) | 2(3.9) | 5(9.8) | 1(2.0) |

\*Type I: *mecA* type, II: *femA* type, III: *mecR1* type, IV: *mecA-femA* type, V: *mecA-mecR1* type, VI: *mecA-femA-mecR1* type, VII: *mecA-femA-mecR1-mecI* type

**Table 6.** Relationship between Multidrug Resistant Patterns and Associated Gene of *mecA* with *Staphylococcus aureus*

| No. of drugs resistant | Strains(%) | Types* |    |     |    |   |    |     |
|------------------------|------------|--------|----|-----|----|---|----|-----|
|                        |            | I      | II | III | IV | V | VI | VII |
| 4                      | 5( 9.8)    | 2      | 1  | 1   | 1  | 0 | 1  | 0   |
| 3                      | 21(41.2)   | 1      | 0  | 7   | 3  | 1 | 2  | 0   |
| 2                      | 15(29.4)   | 1      | 0  | 1   | 5  | 0 | 1  | 0   |
| 1                      | 6(11.8)    | 0      | 0  | 1   | 1  | 0 | 1  | 0   |
| 0                      | 4( 7.8)    | 0      | 0  | 0   | 0  | 1 | 0  | 1   |

\*Type I: *mecA* type, II: *femA* type, III: *mecR1* type, IV: *mecA-femA* type, V: *mecA-mecR1* type, VI: *mecA-femA- mecR1* type, VII: *mecA-femA-mecR1-mecI* type



**Fig. 4.** Representative of the AP-PCR assay. The result obtained with primer 4. Lane M: Mixture of phage  $\lambda$  DNA digested with *Hind*II and phage  $\Phi$ X174 DNA digested with *Hae*III(molecular size marker) lane 1: I type, lane 2 and 3: II type, lane 4: III type, lane 5: IV type, lane 6: V type, lane 7: VI type, lane 8: VII type, lane 9: VIII type, lane 10: IX type, lane 11 and 12: X type.

였다. 본 연구에서는 신생아 28명에서 120회의 nasal swab 중 51주의 *S. aureus* 분리되어 42.5%의 검출률을 보였으며, 항생제 감수성 검사에서는 23주(45.1%)가 oxacillin에, 6주(11.8%)가 vancomycin에 내성을 보여 내성균의 빈도가 심각하였다.

*S. aureus*의 항균제 내성에 관여하는 플라스미드는 대개 3가지 유형이 거론되는데, 첫째는 크기가 2.5-5 kb인 small multi-copy plasmid들로 이는 tetracycline, streptomycin, chloramphenicol, kanamycin 및 cadmium에 대한 내성에 관여한다. 둘째는 크기가 25-35 kb인 large plasmid들로 이들은 penicillin과 inorganic ions에 대한 내성에 관여한다. 셋째는 그 크기가 40-60 kb인 large conjugative plasmid들로 이들은 gentamycin, penicillin, neomycin 및 quaternary ammonium compound에 대한 내성에 관여한다<sup>20</sup>. 이와 같이 *S. aureus*에는 항생제 내성과 관계되는 많은 종류의 플라스미드가 존재하므로 *S. aureus*에서 분리되는 플라스미드 DNA의 수와 크기는 다양하게 보고되

고 있다<sup>21, 22</sup>. 본 연구에서도 *mecA* 및 *femA* 유전자를 보유한 *S. aureus*에서는 각각 1개 내지 4개의 플라스미드를 관찰할 수 있었고, 그 크기는 약 23, 30.7, 32 kb 및 35.5 kb였다.

*S. aureus*가 항생제 내성을 나타내는 기전은 *mecA* 유전자가 가장 중요한 역할을 하며, 그 외 여러 *mecA* 조절 유전자들과 또 다른 유전자들에 의해 조절되고 있는 것으로 밝혀지고 있다. MRSA는 분자량이 74,000-78,000인 변형 페니실린 결합 단백질인 PBP-2'을 가지고 있으며, 이 단백질은  $\beta$ -lactam계 항생제에 매우 낮은 결합력을 갖는데, 이 PBP-2'는 *mecA* 유전자에 의해 조절되기 때문에 *mecA* 유전자의 획득으로 methicillin에 대한 내성을 갖게 된다고 한다<sup>23, 24</sup>. Ubukata 등<sup>25</sup>은 51주의 내성균 모두에서 *mecA* 유전자가 규명되었으며, 46주의 감수성이 있는 균에서는 한 주에서만 *mecA* 유전자가 발견되었다고 하였다. Murakami 등<sup>26</sup>은 *mecA* 유전자 음성인 99균주 중에서 97균주가 oxacillin 감수성이었으며 *mecA* 유전자 양성인 111균주 중에서 108주가 oxacillin 내성임을 보고하였다. 본 연구에서는 oxacillin에 내성인 23균주 중 10주가 *mecA* 양성이었으며 oxacillin에 감수성인 28균주 중 12균주가 *mecA* 유전자 양성이었다. 이처럼 *mecA* 유전자가 양성되면서 oxacillin에 감수성을 보이는 경우는 충분한 PBP-2'를 생성하지 못하기 때문으로 Murakami 등<sup>26</sup>은 설명한 바 있다. 또한 본 연구에서는 관찰하지 않았으나 아주 많은 양의  $\beta$ -lactamase를 생산하여 *mecA* 유전자가 음성 이면서 methicillin에 내성을 얻게 되는 경우도 있는데, 이런 균주는 주로 플라스미드에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있다<sup>27</sup>.

*mecA* 유전자의 상류에 반대 방향으로 두 개의 조절 유전자가 존재하는 것이 밝혀져 각각 *mecR1*, *mecI*로 명명되었으며<sup>6-8</sup>, 그 후 *mecI* 유전자가 *mecA* 유전자의 전사와 PBP2' 생성을 억제한다는 것이 밝혀졌다. 대부분의 MRSA에서 *mecI* 유전자의 변이, 결손 또는 *mecI*의 결합 부위에 있는 *mecA* 유전자의 operator에 변이가 있고 그 때문에 *mecI*의 억제 기능이 상실되어 *mecA*가 출현하여 내성을 나타낸다고 한다<sup>28</sup>. 본 연구에서는 *S. aureus* 51균주 중 22주에서 *mecA* 유전자가 양성이었으며, *mecA* 관련 유전자 중에서 *mecR1* 유전자는 19주, *mecI* 유전자는 1주, *femA* 유전자는 18주에서 양성이었다.



Hurlimann-Dalel 등<sup>29)</sup>은 *S. aureus*의 감염 추세를 관찰하였는데, 1984년에 분리된 *S. aureus*는 대부분이 *mecA-mecR1-mecI*형이었는데 반해, 1992년 methicillin 내성 *S. aureus*에서는 조절 유전자가 없는 *mecA*형(117균주)이 조절 유전자를 가지고 있는 *mecA-mecR1-mecI*형(33균주)보다 많이 분리되었다고 하였다. 본 연구에서는 *mecA*형은 14주였고, *mecA-mecR1-mecI*형은 1주로 지역적인 차이가 있을 것으로 생각된다. 또한 花木와 平松<sup>30)</sup>은 1980년대에는 장독소 A형 생성주가 70% 이상이었으나 1990년대는 장독소 C형 생성주가 70% 이상이었으며, TSST-1의 생성률은 1980년대는 5% 이하였으나 1990년대에는 80% 이상이었다고 보고하였다. 본 연구에서도 장독소 A, B, D, 및 E의 유전자는 검출되지 않았고 장독소 C의 유전자가 64.7%, TSST-1의 유전자가 80.4%에서 검출되어 국내의적으로 *S. aureus*의 장독소 C형과 TSST-1 독소 생성 균주가 유행하고 있다고 판단된다. 감염성 장염<sup>31)</sup>은 일반적으로 장독소에 의한 것으로 알려져 있으므로 비강에서 장독소를 생성하는 균이 검출된 것은 신생아에 설사증을 일으킬 소인이 될 수 있을 것으로 사료된다.

TSST-1은 penicillinase 생성하는 *S. aureus*가 생성하는 것으로 알려졌다<sup>32)</sup>, 현재는 MRSA를 비롯하여 많은 *S. aureus*가 생성하는 것으로 밝혀졌다. 岡田<sup>33)</sup>의 보고에 의하면 신생아에서 분리된 MRSA 59주 중 56주(95%)가 TSST-1 생성 균주였다고 하였으며, 본 연구의 결과에서도 80.4%에서 TSST-1 유전자가 검출되었다.

Protease는 농양 형성에 관여하는데, 본 연구에서는 전 균주가 protease를 생성하였다. 이로 인해 이들 신생아에서 농가진을 일으킬 가능성이 높을 것으로 추측된다.

*S. aureus*의 원내 감염의 경로나 유행 균주의 해석을 위해 coagulase 형별<sup>34)</sup>, phage형<sup>35)</sup>, 항생제 감수성 양상<sup>34, 36-38)</sup>, chromosomal DNA나 plasmid DNA를 여러 종류의 효소로 절단한 전기영동의 양상<sup>35, 36)</sup> 등이 이용되고 있다. 또한 균체 성분이나 대사 단백질의 SDS PAGE의 profile의 해석도 이용되고 있다<sup>37, 39)</sup>. 임상 검사실에서 특히 항혈청으로 이용하는 coagulase 형별 검사는 간단하지만 여러 보고에서 *S. aureus*의 대부분이 II형과 IV형에 집중되어 있는 경향이 있어<sup>34)</sup> 역학적 조사의 지표로서 이용가치가 낮다고 할 수 있다. 본 연구에서 PCR법을 이용한 coagulase 형별은 세분화되어 분류할 수 있으므로 앞으로 이용 가치가 기대된다. Plasmid DNA profile의 해석은 본 연구에서는 임의적으로 I형에서 III형으로 분류할 수 있었지만, 제한 효소로 DNA를 절단한 후 전기영동의 결과 해석은 아직 일반화되어 있지 않고 재현성에도 문제점이 있다고 할 수 있다. 본 실험에 사용한 AP-PCR에 의한 genomic DNA fingerprinting법은 24시간 이내에 결과를 얻을 수 있으며 간편하면서 재현성과 예민성에서 양호하였다.

본 연구는 국내에서 처음으로 입원 중인 신생아의 비강에 상재하는 *S. aureus*의 빈도와 이들의 병원성 인자 및 관련 유전자를 분석함으로써 집중하고 있는 원내 감염에 적절한 대책을 수

립하고 효과적인 항생제 요법으로 내성균의 출현을 막는데 많은 도움을 줄 수 있으리라 사료된다.

## 요 약

**목적 :** 황색포도구균(*S. aureus*)은 건강인의 비강이나 피부에 정상 세균총으로 존재하지만, 병원 내 감염과 항생제 내성이 문제가 되고 있다. 본 연구는 신생아의 비강에서 *S. aureus*를 분리하여 항생제 감수성의 양상과 내성 관련 유전자를 검출하여 내성의 정도와 내성 관련 유전자의 상관관계를 규명해 보고자 하였으며, 병원성 인자의 검출을 실시하고, arbitrarily-primed polymerase chain reaction(AP-PCR)법에 의한 유전자형별을 통하여 역학적 해석을 시도하였다.

**방법 :** 2001년 2월에서 5월 사이에 부산대학교병원 신생아 중환자실 및 신생아실에 입원한 28명을 대상으로 이들의 비강에서 총 120회의 nasal swab을 실시하여 51주의 *S. aureus*를 분리하였다. 분리균에 대한 항생제 감수성 검사, coagulase 검사와 형별, plasmid DNA의 양상, *mec* 관련 유전자의 분포, 장독소의 유전자 및 TSST-1 독소의 유전자 보유 상태, AP-PCR법으로 유전자 형별을 조사하였다.

### 결 과 :

- 1) Methicillin 내성이 23주, vancomycin 내성이 6주였고, 3가지 이상의 약제에 대한 내성이 절반 이상을 차지하였다.
- 2) 42주가 coagulase 양성이었고, 이중 *mecA* 및 *femA* 유전자를 보유한 12주를 대상으로 한 형별 검사에서 8종(coagulase I-VIII형)으로 분류되었다.
- 3) *mecA* 유전자가 22주에서, *mecR1* 유전자가 18주, *mecI* 유전자가 1주, *femA* 유전자가 17주에서 발견되었으며, 이들을 4가지의 유전자형으로 분류하였을 때 *mecA*형이 14주, *mecR1*형 10주, *mecA-mecR1*형 7주, *mecA-mecR1-mecI*형이 1주였다. *mecA* 및 *mecA* 관련 유전자와 항생제 다제내성과는 상관관계가 없었다.
- 4) 16주가 *mecA*와 *femA*를 모두 보유하였으며, 이들의 plasmid 양상은 I형이 7주, II형이 6주 그리고 III형이 2주였다. Oxacillin 및 vancomycin에 내성을 보이는 II형과 III형에서는 35.5 kb의 plasmid DNA를 보유하였다.
- 5) 장독소 A, B, D, 및 E의 유전자는 51주 전부에서 검출되지 않았으나 장독소 C의 유전자는 64.7%, TSST-1 유전자는 80.4%가 양성이었다.
- 6) Coagulase 양성이며 *mecA* 및 *femA* 유전자를 보유한 MRSA 12균주에 대한 유전자 형별 검사에서 I형에서 X형으로 분류할 수 있었으며, II형 2주, X형 2주가 동일 유전자형이었고, 나머지는 다른 유전자형이었다.

**결론 :** 입원 중인 신생아의 비강 내 *S. aureus*의 상재률이 아주 높았으며, 이들의 항생제 내성률, 특히 vancomycin의 내성률이 높아 이들에 의한 원내 감염에 대한 특별한 관리가 필요하

며, 이들의 병원성 인자 및 관련 유전자에 대한 분석은 원내 감염에 대한 적절한 대책과 효과적인 치료에 많은 도움을 줄 수 있으리라 사료된다.

**참 고 문 헌**

- 1) Kluytmans J, Belkum AV, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*; Epidemiology, underlying mechanisms and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997;10: 505-20.
- 2) Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster ML, Robinson-Dunn B, et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 1999; 340:493-500.
- 3) Mackenzie A, Johnson W, Heyes B. Prolonged outbreak of exfoliative toxin A producing *Staphylococcus aureus* in a newborn nursery. *Diag Microbiol Infect Dis* 1995;21:69-75.
- 4) Richardson JF, Quoraishi AH, Francis BJ, Marples RR. Beta-lactamase-negative, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a newborn nursery: report of an outbreak and laboratory investigations. *J Hosp Infect* 1990;16:109-21.
- 5) Thompson RL, Cabezudo I, Wenzel RP. Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med* 1982;97:309-17.
- 6) Suzuki E, Hiramatsu K, Yokota T. Survey of methicillin-resistant clinical strains of coagulase-negative staphylococci for *mecA* gene distribution. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:429-34.
- 7) Tokue Y, Shoji S, Satoh K, Watanabe A, Motomiya M. Comparison of polymerase chain reaction assay and conventional microbiologic method for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:6-9.
- 8) Hiramatsu K, Asada K, Suzuki E, Okonogi K, Yokota T. Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA). *FEBS Lett* 1992;298:133-6.
- 9) Maidhof H, Reinicke B, Blumel P, Berger-Bachi B, Labischinski H. *femA*, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J Bacteriol* 1991;173: 3507-13.
- 10) Berger-Bachi B, Barberis-Maino L, Strassle A, Kayser FH. *femA*, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Molecular cloning and characterization. *Mol Gen Genet* 1989;219:263-9.
- 11) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 5th Ed. Approved Standard M7-A4., Villanova, Pa. USA. 1993.
- 12) Martley FG, Jarvis AW, Bacon DF, Lawrence RC. Typing of coagulase-positive staphylococci by proteolytic activity on buffered casein-agar, with special reference to bacteriophage nontypable strains. *Infect Immun* 1970;2:439-42.
- 13) Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *J Clin Microbiology* 1998;36:1083-9.
- 14) Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979;7:1513-23.
- 15) Berger-Bachi BL, Maino B, Strassle A, Kayser FH. *FemA*, a host-mediated factor essential for methicillin resistant in *Staphylococcus aureus*: Molecular cloning and characterization. *Mol Gen Gene* 1985;219:263-9.
- 16) Dyer DW, Iandolo JJ. Rapid isolation of DNA from *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 1983;46:283-5.
- 17) Kim YB. Studies on virulence factors and application of arbitrarily-primed polymerase chain reaction analysis to epidemiological of *Escherichia coli* O157:H7. *J Bact Virol* 2001;31:123-31.
- 18) 松村久美, 高橋あずさ, 坂田 安. NICUに入院した低出生体重児におけるmethicillin resistant *S. aureus*の検出状況. *環境感染* 1999;14:189-91.
- 19) Sakata H. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from nasopharyngeal swabs on admission to ward for pediatric patients: Comparison between 1992-1993 and 1997-1998. *J Jap Assoc Infect Disease* 2001;75:14-9.
- 20) Lacey RW. Antibiotic resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance. *Bacteriol Rev* 1975;39:1-32.
- 21) Kang H, Chung YS, Kim SY, Lee HH. Isolation and transfer of *Staphylococcus R*-plasmids. *J Kor Soc Microbiol* 1989;24:435-41.
- 22) Novick RP. Penicillinase plasmids of *Staphylococcus aureus*. *Fed Proc* 1967;26:29-38.
- 23) Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1984;158:513-6.
- 24) Rossi LE, Tonin Y, Cheng YR, Fontana R. Regulation of penicillin-binding protein activity: description of a methicillin-inducible penicillin-binding protein in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;27:828-31.
- 25) Ubukata K, Nakagami S, Nitta A, Yamane A, Sugiura M, Konno M, et al. Rapid detection of a *mecA* gene in methicillin-resistant strains of *Staphylococci* by enzymatic detection of polymerase chain reaction products. *J Clin Microbiol* 1992;30:1728-33.
- 26) Murakami K, Minamide W, Wada K, Makamura E, Terakawa H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of *Staphylococci* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991;29:2240-4.
- 27) McDougal LK, Thornsberry C. The role of beta-lactamase in *Staphylococcal* resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J Clin Microbiol* 1986;23:832-9.
- 28) Suzuki E, Kuwahara-Arai K, Richardson JF, Hiramatsu K. Distribution of *mec* regulator genes in the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1219-26.
- 29) Hurlimann-Dalel RL, Ryffel C, Kawaga S, Yamashita K, Matsuoka A. MRSA-detection of *mecA* and its regulatory genes. *Jpn J Clin Pathol* 1993;41:1223-31.



- 30) 花木秀明, 平松啓一. MRSAの變遷とVancomycin耐性MRSAの出現. 臨床科學 1997;33:1052-9.
- 31) Martley FG, Jayashankar SR, Lawrence RC. An improved agar medium for the detection of proteolytic organisms in total bacterial counts. J Appl Bacteriol 1970;33:363-70.
- 32) Chesney PJ, Davis JP, Purdy WK, Wand PJ, Chesney RW. Clinical manifestations of toxic shock syndrome. JAMA 1981;246:741-8.
- 33) 岡田降滋. 毒素産生MRSAによるsuper抗原關聯新生兒發疹症. 感染症學雜誌 2001;75:54-5.
- 34) Takesue Y, Fujimoto M, Okita M, Murakami Y, Imamura Y, Tsumura H, et al. Methicillin resistant Staphylococcus aureus in nosocomial infections in the surgical ward and operating room. Hiroshima J Med Sci 1989;38:183-6.
- 35) Archer GL, Mayhall CG. Comparison of epidemiological markers used in the investigation of an outbreak of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. J Clin Microbiol 1983;18:395-9.
- 36) Kozarsky PE, Rimland D, Terry PM, Wachsmuth K. Plasmid analysis of simultaneous nosocomial outbreaks of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Infect Control 1986;7:577-81.
- 37) Lee W, Burnie JP. Fingerprinting methicillin-resistant Staphylococcus aureus by the immunoblot technique. J Med Microbiol 1988;25:261-8.
- 38) Gillespie MT, Lyon BR, Skurray RA. Typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by antibiotic resistance phenotypes. J Med Microbiol 1990;31:57-64.
- 39) Krikler SJ, Pennington TH, Petrie D. Typing of strains of Staphylococcus aureus by western blot analysis of culture supernates. J Med Microbiol 1986;21:169-71.